

# Wysiłkowa indukcja stresu oksydacyjnego u koni oraz antyoksydacyjna ochrona organizmu

BOGDAN JANICKI, ANNA KOCHOWICZ,  
DOROTA CYGAN-SZCZEGIELNIAK, WIESŁAW KRUMRYCH\*

Katedra Biologii Małych Przeżuwaczy i Biochemii Środowiska Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt UTP,  
ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz

\*Zakład Fizjopatologii Rozrodu i Gruczołu Mlekowego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach,  
Oddział w Bydgoszczy, ul. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz

Janicki B., Kochowicz A., Cygan-Szczegielniak D., Krumrych W.

## Strain induction of oxidative stress in horses and anti-oxidative protection of the organism

### Summary

The attention recently being paid to strain induction of oxidative stress has resulted in numerous studies, conducted mainly on sportsmen and laboratory animals, the majority of which focused on performing tests during a strenuous endurance effort (15, 31, 41, 54). As a consequence, the disturbance of the pro-oxidative/anti-oxidative balance has been noted, which in most cases was manifested by a drop of activity of the main anti-oxidative enzymes in erythrocytes and muscle cells (65, 68), as well as an increase in content of products of lipid peroxidation in blood (11, 15, 58, 68). In spite of some discrepancies between them, the results of the research so far seem to indicate that the level of oxidative stress remains closely connected with the intensity and duration of physical strain (20, 42, 62).

The aim of the paper was to present the impact of physical effort on the induction of oxidative stress in horses and to describe the features of anti-oxidative protection, in spite of some discrepancies between them, of the organism.

**Keywords:** horses, oxidative stress, reactive oxygen species, anti-oxidants

Źródłem energii w komórkach organizmów aerobowych jest mitochondrialny proces fosforylacji oksydacyjnej. Wykazano, że dostarcza on ponad 90% adenozynotrifosforanu (ATP). Pozostałe 10% ATP powstaje w wyniku beztlenowej glikolizy, zachodzącej w cytoplazmie (19). W procesie oddychania komórkowego tlen, reagując z innymi pierwiastkami, utlenia je, sam ulegając redukcji. Pełna redukcja cząsteczki  $O_2$  oznacza przyłączenie (przy udziale oksydazy cytochromowej) czterech protonów  $H^+$  oraz czterech elektronów, produktem czego są dwie cząsteczki wody z równoczesnym uwalnianiem energii.

### Reaktywne formy tlenu

W procesie oddychania komórkowego, który stanowi podstawę tlenowego oddychania, uczestniczy około 95% wdychanego tlenu (5). Wartość ta wskazuje, że mitochondrialny kompleks enzymatyczny wytwarzający energię nie jest jednak całkowicie sprawny. Pozostała część (ok. 5%) podlega niecałkowitej redukcji, w wyniku czego powstają jony, atomy lub cząsteczki posiadające na swej powłoce walencyjnej przynajmniej

jeden niesparowany elektron (19). Te bardzo nietrwałe, ale wysoce reaktywne związki – tzw. wolne rodniki tlenowe – razem z innymi, reaktywnymi pochodnymi tego pierwiastka określane są mianem reaktywnych form tlenu (*reactive oxygen species* – ROS) (5, 52).

W chwili obecnej właściwości reaktywne przypisuje się około 30 różnym formom tlenu (np. nadtlenuk wodoru –  $H_2O_2$ , tlen singletowy –  $^1O_2$ ), a także azotu (NO i  $NO_2$ ). NO może reagować z  $O_2^-$ , dając nadtlenoazotyn ( $ONOO^-$ ) o długim okresie półtrwania i właściwościach kurczących naczynia, zwłaszcza że przebieg tej reakcji jest szybszy niż reakcji  $O_2^-$  z SOD (3, 7, 30). Różnorodność ROS potęguje ich zdolność do reakcji ze związkami organicznymi, prowadzącej do powstawania kolejnych wolnorodnikowych związków organicznych, przy czym niesparowany elektron może znajdować się na atomie tlenu, węgla lub azotu (5). Zróźnicowanie tych form zdaje się wskazywać na różne źródła ich powstawania. Oprócz mitochondrialnego i mikrosomalnego łańcucha oddechowego należy tutaj wymienić m.in.: aktywowane fagocyty, autooksydację związków biologicznie aktywnych (katecholaminy,

związki tiolowe, hydrochinony, flawonoidy czy hemoglobina), przemiany kwasu arachidonowego oraz reakcje katalizowane przez jony metali przejściowych, np. Fe, Cu, Co, Mn (23, 35, 55). Na podkreślenie zasługuje również udział czynników zewnętrznych w generowaniu ROS, powodujących zaburzenia równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej w organizmie. Właściwości takie przypisuje się głównie promieniowaniu jonizującemu i ultrafioletowemu, ultradźwiękom, wysokiej temperaturze, zanieczyszczeniom przemysłowym powietrza oraz różnym lekami (5, 15).

Biologiczne skutki obecności ROS w organizmie są uwarunkowane przede wszystkim ich stężeniem oraz czasem oddziaływania. Po stronie korzystnych dla ustroju właściwości tych toksycznych związków należy wymienić przede wszystkim ich udział w mechanizmach obronnych. Najlepszym tego przykładem są komórki fagocytarne (neutrofile, makrofagi), które wykorzystują ROS do niszczenia drobnoustrojów. W wyniku aktywacji tych komórek przez m.in. bakterie i ich produkty, immunoglobuliny, cytokiny, fragmenty dopełniacza dochodzi (przy udziale oksydazy NADPH) do wytwarzania anionorodnika ponadtlenkowego i jego pochodnych (35, 61). Uwolnione w ten sposób ilości ROS są tak duże, że proces ten nazywany jest „wybuchem oddechowym” (*respiratory burst*) (6). Potwierdzają to m.in. badania, w których wykazano, że neutrofile generują 3-krotnie więcej anionorodnika ponadtlenkowego w porównaniu z komórkami niefagocytującymi (52).

Wykazano również udział ROS w transdukcji sygnału wewnątrzkomórkowego komórek immunokompetentnych, m.in. limfocytów T i B. Z kolei inne badania potwierdziły zaangażowanie ROS w indukcję adhezji leukocytów, aktywację układu krzepnięcia krwi oraz różnicowanie, dojrzewanie i programowanie apoptozy komórek (4, 14, 24, 28).

Nadmiar reaktywnych form tlenu w stosunku do ochrony antyoksydacyjnej wywołuje wiele następstw szkodliwych dla organizmu. Jednym z najlepiej poznanych jest peroksydacja wielonienasyconych i estryfikowanych kwasów tłuszczowych błon komórkowych. Efektem tej reakcji łańcuchowej jest m.in. zwiększenie przepuszczalności błon komórkowych, hamowanie aktywności enzymów błonowych, łącznie z utratą zdolności do wybiórczego transportu (13, 19).

Reakcje ROS (głównie  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) z białkami mogą przebiegać zarówno w sposób bezpośredni, powodując ich fragmentację, denaturację, agregację, połączenia krzyżowe lub modyfikację aminokwasów, jak i pośredni – poprzez reakcje z udziałem nadtlenków, powodując uszkodzenia białek transportowych w błonach komórkowych oraz receptorów powierzchniowych (10). Zarówno  $\cdot\text{OH}$ , jak i  $\text{ONOO}^-$  i  $\text{HOCl}$  są najbardziej reaktywnymi formami, co zwiększa prawdopodobieństwo uszkodzeń oksydacyjnych. W obrębie cytozolu ROS powodują natomiast inaktywację

istotnych dla metabolizmu komórki enzymów, takich jak: dehydrogenaza mleczanowa (LDH), fosfataza zasadowa (AP) i kinaza kreatynowa (CK). Miejscami szczególnie narażonymi na ROS są grupy tiolowe, jony metali w metaloproteinach oraz oligosacharydy, będące często aktywnymi elementami enzymów katalitycznych i białek transportowych. Powoduje to unieczynienie funkcji tych białek, łącznie z upośledzeniem mechanizmów odpornościowych układu dopełniacza i immunoglobulin (34).

Wolne rodniki (zwłaszcza rodnik hydroksylowy) reagują również z kwasami nukleinowymi, powodując uszkodzenia ich struktury, pęknięcia nici DNA, a nawet całych chromosomów (7). Skutkiem tych procesów jest zwykle mutacja materiału genetycznego, mogąca indukować procesy nowotworzenia, a nawet śmierć komórki (5, 15).

W ostatnich latach stwierdzono, że także węglowodany są narażone na „atak” ROS. Efektem ich działania jest rozrywanie wiązań glikozydowych pomiędzy monomerami oraz wzrost ich podatności na hydrolizę. Uszkodzenia reszt cukrowych glikolipidów, a zwłaszcza glikoprotein na powierzchni komórek mogą prowadzić do zmian właściwości antygenowych tych cząsteczek (5).

O skali niebezpieczeństwa ze strony nadmiaru ROS świadczy choćby fakt, że do chwili obecnej wykazano ich udział w etiopatogenezie około 100 różnych jednostek chorobowych, wśród których wymienia się nowotwory, choroby sercowo-naczyniowe i degeneracyjne (5). Przypuszcza się, że kumulujące się w trakcie życia uszkodzenia wolnorodnikowe są przyczyną starzenia się organizmów (26).

Zagrożenia wynikające z obecności toksycznych metabolitów tlenu w organizmie były impulsem do wykształcenia na drodze ewolucji wielu skutecznych mechanizmów ochronnych. W warunkach fizjologicznych poziom ROS jest ściśle kontrolowany przez złożony system enzymatycznych i nieenzymatycznych czynników antyoksydacyjnych. Istotą działania tego systemu jest: niedopuszczenie do powstawania ROS i ich reakcji ze składnikami komórkowymi, przerwanie łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych oraz usuwanie skutków reakcji ROS z makromolekułami (5).

### Antyoksydacyjna ochrona organizmu

W ochronie antyoksydacyjnej organizmu zasadniczą rolę przypisuje się tzw. triadzie enzymatycznej, w skład której wchodzi: dysmutaza ponadtlenkowa – SOD, peroksydaza glutationowa – GPx, reduktaza glutationowa, katalaza – CAT (71), a także tioredoksyny, glutaredoksyny i peroksyredoksyny (4, 5).

Dysmutaza ponadtlenkowa jest enzymem katalizującym reakcję dysmutacji (dysproporcjonacji) anionorodnika ponadtlenkowego do  $\text{H}_2\text{O}_2$  (71). Różne jej izoformy (Cu/ZnSOD, MnSOD) zlokalizowane są w cytozolu i mitochondriach (70-90%), a także w przestrzeni

pozakomórkowej (16, 71). Aktywność SOD w organizmie uwarunkowana jest przede wszystkim stężeniem  $O_2^{\cdot-}$  oraz dostępnością Cu, Zn i Mn. Jest ona tym większa, im większe jest stężenie anionorodników ponadtlenkowych, natomiast maleje wraz ze wzrostem zawartości  $H_2O_2$  (20). Powstały w wyniku aktywności SOD nadtlenek wodoru jest substratem dla wytwarzania bardzo reaktywnej formy – rodnika hydroksylowego ( $\cdot OH$ ), zagrożeniu temu przeciwdziałają jednak przede wszystkim obecność peroksydazy glutationowej oraz katalazy. Enzymy te, będące efektywnymi katalizatorami reakcji prowadzących do usuwania  $H_2O_2$ , w znacznym stopniu ograniczają inicjację procesów peroksydacyjnych (5, 71).

Peroksydaza glutationowa występuje w kilku formach, wśród których największe zainteresowanie budzi GPx Se-zależna, mająca zdolność katalizowania redukcji  $H_2O_2$ , a także GPx Se-niezależna, biorąca udział w redukcji organicznych wodoronadtlenków (41, 71). Dawcą protonów w tych reakcjach jest zredukowany glutation (GSH), który zostaje przekształcany do formy utlenionej (GSSG) (57). Szacuje się, że 70% aktywności GPx przypada na cytoplazmę, 20% na mitochondria oraz 10% na jądro komórkowe (5). Kwas mlekowy jako dawca jonów wodorowych nie dopuszcza do utleniania GSH i jest uważany za reduktor czynników utleniających. Jego średni spoczynkowy poziom we krwi u koni wyścigowych i trenowanych wynosi 0,3-0,7 mmol/l, natomiast u koni przygotowywanych do rajdów długodystansowych 0,8-1,0 mmol/l (8).

Udział w usuwaniu produktu dysmutazy ponadtlenkowej, jakim jest  $H_2O_2$ , ma także katalaza. Produktami reakcji katalizowanej przez wspomnianą oksydoreduktazę są  $H_2O$  i  $O_2$ . Ten wewnątrzkomórkowy enzym, zlokalizowany w cytoplazmie i peroksysomach, pomimo dużej szybkości działania odznacza się jednak mniejszym powinowactwem do  $H_2O_2$  niż GPx. Swoistość katalazy do tego substratu wzrasta dopiero przy wyższych jego stężeniach, co ma miejsce podczas wybuchu oddechowego fagocytów lub przy nadekspresji SOD (5, 41).

Aktywność dysmutazy, peroksydazy i katalazy w płynach pozakomórkowych jest stosunkowo niewielka. Za antyoksydacyjną ochronę organizmu w tym obszarze odpowiadają głównie białka wiążące jony metali, (ferrytyna, ceruloplazmina, transferyna, laktoferyna, haptoglobina), które stanowią zabezpieczenie przed powstawaniem rodników hydroksylowych z udziałem tych pierwiastków (71). W płynach ustrojowych znajduje się również wiele antyoksydantów drobnocząsteczkowych (tzw. zmiataczy wolnych rodników). Należy wymienić tutaj przede wszystkim takie związki endogenne, jak: kwas moczowy (powstający z degradacji nukleotydów purynowych), bilirubinę, glutation, pirogronian, albuminy oraz egzogenne: kwas askor-

bowy,  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten, karnozynę czy melatoninę (57, 58, 71).

Ważną pozycję w systemie antyoksydacyjnym zajmują także mikroelementy (Zn, Cu, Se). Ich znaczenie wynika głównie z obecności w składzie enzymów antyoksydacyjnych (SOD, GPx). Związek ten potwierdzono m.in. u ludzi, wykazując, że skutkiem ograniczenia podaży Zn w diecie był spadek aktywności SOD we krwi o około 1/5 (54).

Przedstawione wyżej związki wzajemnie współdziałają ze sobą, tworząc system ochrony antyoksydacyjnej. Aktywność antyutleniająca komórek i tkanek jest zazwyczaj doskonale dostosowana do tempa konsumpcji tlenu i produkcji wolnych rodników, skutecznie chroniąc organizm przed uszkodzeniami tlenowymi (5). W niektórych przypadkach może jednak dojść do braku równowagi między wielkością produkcji ROS a potencjałem antyoksydacyjnym organizmu w kierunku reakcji utleniania. Stan ten, określany jako „stres oksydacyjny” (*oxidative stress*), może być wynikiem zarówno zwiększonego tempa endogennej produkcji ROS, ekspozycji na dodatkowe czynniki indukujące, jak i niedoborów związków antyoksydacyjnych w komórkach lub płynach ustrojowych (5). Stwierdzono przy tym, że zjawisko to może towarzyszyć nie tylko stanom patologicznym (np. stanom zapalnym), ale także również może mieć charakter fizjologiczny (np. wysiłek fizyczny, stres emocjonalny) (11, 36).

Intensyfikacja procesów wolnorodnikowych w przebiegu wysiłku fizycznego spowodowana jest przede wszystkim nawet 35-krotnym wzrostem ilości pobieranego tlenu, wymuszonym zwiększonym zapotrzebowaniem pracujących mięśni na energię. Ponieważ ok. 5% ogółu tlenu docierającego do mitochondrialnego łańcucha oddechowego podlega niecałkowitej redukcji, nieuchronną konsekwencją zwiększonego pobierania tlenu cząsteczkowego jest wzrost produkcji ROS w takiej samej proporcji (59, 69). Należy przy tym zaznaczyć, że ilość tlenu pobieranego przez kurczące się włókna mięśniowe jest znacznie zwiększana poprzez:

- aktywację komórek fagocytarnych (głównie neutrofilów) wywołaną uszkodzeniami włókien mięśniowych (50, 63),
- zwiększoną zawartość katecholamin w krwi; skutkiem autooksydacji tych hormonów do adrenochromu jest powstawanie m.in.  $O_2^{\cdot-}$  (25),
- intensyfikację autooksydacji oksyhemoglobiny do methemoglobiny skutkującą zwiększonym generowaniem nadtlenków (9),
- ischemię i reperfuzję.

Niedotlenienie komórek mięśniowych podczas intensywnych skurczów hamuje mitochondrialną fosforylację oksydacyjną, prowadząc do przyspieszonego rozpadu ATP. Produkty tego rozpadu (ksantyna i hipokszantyna) są substratami dla oksydazy ksantynowej katalizującej reakcje, w wyniku których powstaje  $O_2^{\cdot-}$

i  $H_2O_2$  (42). Z kolei szybkie przywrócenie pełnego przepływu krwi (reperfuzja) podczas rozkurczu mięśni wywołuje reoksygenację związaną z generowaniem dużych ilości ROS (53) oraz hipertermią wysiłkową i spadkiem pH krwi (8, 12).

### Wpływ indukcji stresu oksydacyjnego na organizm koni

W warunkach fizjologii stres oksydacyjny występuje w przebiegu intensywnego wysiłku fizycznego, a w patologii – m.in. w stanach zapalnych, chorobach przewlekłych oraz po zabiegach operacyjnych (1).

Zainteresowanie wysiłkową indukcją stresu oksydacyjnego znalazło swój wyraz w licznych badaniach prowadzonych głównie na sportowcach oraz zwierzętach laboratoryjnych, przy czym większość z nich realizowano w przebiegu wyczerpującego wysiłku wytrzymałościowego. Należy jednak podkreślić, iż stres oksydacyjny oraz związane z nim uszkodzenia oksydacyjne zależą przede wszystkim od długotrwałości wysiłku (17, 39, 59), jego intensywności, rasy oraz płci zwierzęcia (28), a także jego kondycji i warunków klimatycznych panujących podczas przeprowadzania badań (27, 38, 51, 60). W następstwie tych obciążeń stwierdzano zaburzenia równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej, manifestujące się najczęściej spadkiem aktywności głównych enzymów antyoksydacyjnych (SOD, GPx i CAT) w erytrocytach i komórkach mięśniowych (62, 64) oraz zwiększoną zawartością produktów peroksydacji lipidów we krwi (11, 55, 60, 64). Inne badania wykazały wzrost aktywności CAT w płynie oskrzelowo-pęcherzykowym u koni w przebiegu wyczerpującego wysiłku w porównaniu z jej poziomem u koni pozostających w stanie spoczynku (29). Uważa się, że prezentowane, czasami sprzeczne wyniki badań, zwłaszcza realizowanych w warunkach *in vivo*, mogą być uwarunkowane także rodzajem wysiłku fizycznego, dietą i zaawansowaniem treningowym badanych osobników, a także zastosowanymi metodami badawczymi (8, 55). Wszystko to sprawia, że stres oksydacyjny i jego konsekwencje nie zawsze mogą być porównywalne między badaniami, nawet z zastosowaniem tego samego programu wysiłkowego. Stres oksydacyjny może być związany ze zwiększonym wytwarzaniem ROS, przy normalnej aktywności antyoksydacyjnej lub też wynikiem występowania pewnych fluktuacji w różnych komponentach antyoksydacyjnych (53, 59).

Potencjalnie patogenna rola wysiłkowej indukcji stresu oksydacyjnego była przedmiotem niewielu badań w medycynie weterynaryjnej. Należy jednak zaznaczyć, że u koni obserwacji tych poczyniono relatywnie dużo, aczkolwiek ograniczonych rodzajem stosowanego wysiłku oraz liczbą zwierząt. Większość badań skoncentrowano na indukcji stresu oksydacyjnego w przebiegu wyczerpujących rajdów długodystansowych. W następstwie tych obciążeń wykazywano zwykle

wzrost osoczowych produktów peroksydacji lipidów, korelujący z podwyższoną aktywnością enzymów (CK, AST, LDH), wskazującą na uszkodzenia błon komórek mięśniowych (18, 30, 40, 68, 69). Zmianom tym towarzyszyła jednak bardzo zróżnicowana zmienność zawartości poszczególnych związków antyoksydacyjnych w krwi. Podczas gdy w jednych badaniach rejestrowano u koni poddanych dużym obciążeniom wzrost poziomu GPx i kwasu moczowego (18, 40, 45, 68), w innych wykazywano spadek GSH i witaminy C (22) lub brak zmienności witamin E i C, GSH oraz GPx (30, 40). Poziom witaminy E we krwi lub w mięśniach szkieletowych koni nie jest zmieniony nawet podczas pojedynczego, krótkotrwałego, powtarzającego się wysiłku, a także podczas krótkiego okresu submaksymalnego wysiłku (29). Ponadto u koni wydłużony wysiłek powoduje uszkodzenia oksydacyjne mięśni z powodu ich zapalenia oraz infiltrację fagocytów powodowaną przez ROS (60). Wysiłkowe uszkodzenie tkanek pobudza neutrofile, a co za tym idzie – wytworzenie wolnych rodników z użyciem oksydazy NADPH (7). Zdaniem wielu autorów procesy oksydacyjne zachodzące w pracujących mięśniach w połączeniu z ich słabą ochroną antyoksydacyjną mogą być związane z ich uszkodzeniami, co z kolei przekłada się na nietolerancję wysiłkową oraz słabszą wydolność koni (49, 66). Całkowity status antyoksydacyjny podnosi się u koni po krótkodystansowym wyścigu, zaś po wyczerpującej gonitwie ten status znacznie się obniża. Duże znaczenie mają również różnice indywidualne, gdyż krew koni wytrenowanych charakteryzuje się niższym poziomem kwasu askorbinowego, który rośnie tuż po wysiłku, oraz  $\alpha$ - tokoferolu w porównaniu ze zwierzętami niewytrenowanymi (30, 31, 32), jednak inaczej niż u ludzi i psów, stężenie tego ostatniego u koni nie ulega zmianom zależnym od rodzaju wysiłku (30, 32).

Intensyfikację procesów peroksydacyjnych oraz zmiany potencjału antyoksydacyjnego krwi stwierdzano także u koni poddawanych krótkotrwałym i submaksymalnym testom wysiłkowym na bieżni taśmowej (31, 45, 47). Wyniki uzyskane m.in. przez Kinnunen i wsp. (31) u kłusaków wskazują przy tym na wprost proporcjonalną zależność między wielkością stresu oksydacyjnego a intensywnością wysiłku. Wykazano również, że jednym z ważniejszych czynników warunkujących nadprodukcję ROS jest czas trwania wysiłku (71). Z kolei Mills i wsp. (45) podkreślają znaczenie czynników środowiskowych, wykazując u koni zwiększoną oksydację glutationu w erytrocytach oraz wzrost zawartości produktów peroksydacji lipidów podczas wysiłku realizowanego w warunkach wysokiej temperatury i wilgotności powietrza. Ponadto wzrost temperatury w mitochondriach podczas wysiłku powoduje wzmożenie procesów metabolizmu biochemicznego i energetycznego oraz wzrost ilości wzbudzanego  $O_2^-$  (30).

Pomimo że wysiłek fizyczny jest jednym z czynników wywołujących stres oksydacyjny, wydaje się, że może również stymulować mechanizmy ochronne przed tym stanem. Wykazano bowiem, że regularny, umiarkowany trening prowadzi do zwiększenia spoczynkowego potencjału antyoksydacyjnego koni, skutkującego mniejszym powysiłkowym wzrostem zawartości produktów peroksydacji lipidów oraz aktywności kinazy kreatynowej w porównaniu ze zwierzętami nie objętymi regularnym wysiłkiem (3, 37, 46). Duże znaczenie przypisuje się intensywności stosowanych obciążeń. W następstwie zbyt rozbudowanych programów treningowych wykazywano bowiem osłabienie ochrony antyoksydacyjnej, przejawiające się m.in. spadkiem spoczynkowej aktywności GPx w erytrocytach (2).

Ograniczeniu szkodliwych następstw zwiększonego generowania ROS może służyć także suplementacja diety antyoksydantami egzogennymi. Potwierdzają to badania, w których zarejestrowano częściową redukcję wysiłkowo indukowanego stresu oksydacyjnego po pojedynczym lub zespolonym podawaniu koniom witamin C i E (32, 47, 67). Mimo że w innych nie potwierdzono istotnego wpływu suplementacji na wzrost aktywności antyoksydacyjnej triady enzymatycznej (48) oraz ograniczenie powysiłkowych uszkodzeń mięśni (56), wydaje się, że stosowanie tej strategii, zwłaszcza w przebiegu programu treningowego, może skutecznie przywracać równowagę prooksydacyjno-antyoksydacyjną koni sportowych. Potwierdzają to m.in. badania Avellini i wsp. (3), którzy w wyniku skoordynowanego zastosowania obu tych czynników wykazali u koni istotny wzrost statusu antyoksydacyjnego w płynach pozakomórkowych i komórkach krwi.

### Podsumowanie

Złożone uwarunkowania wyników uzyskiwanych w różnych badaniach sprawiają, że ich porównywanie jest bardzo trudne. Tymczasem zagadnienia te wydają się szczególnie ważne u koni, zwłaszcza w kontekście udziału ROS w patogenezie m.in.: nawracającej obturacji dróg oddechowych, chronicznego zapalenia oskrzeli (33, 44), zapalenia płuc i opłucnej (1), wysiłkowego krwawienia z płuc (43) oraz wysiłkowego zwyrodnienia mięśni prążkowych (65, 66). Należy przy tym podkreślić, że urazy mięśni szkieletowych oraz choroby dróg oddechowych stanowią główną przyczynę czasowej eliminacji z treningu i zawodów oraz pogorszenia osiągnięć koni sportowych. Potwierdzają to wyniki wielu badań wskazujące, że urazy mięśniowo-kostne stanowią około 10% ogółu problemów zdrowotnych koni wyścigowych (21), choroby dróg oddechowych – prawie 14% (70), zaś odsetek występowania wysiłkowo indukowanych krwawień z płuc podczas maksymalnego wysiłku może sięgać nawet 75-95% (49).

### Piśmiennictwo

1. Austin S. M., Foreman J. H., Hungerford L. L.: Case-control study of risk factor for development of pleuropneumonia in horses. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 1995, 207, 325-328.
2. Avellini L., Chiaradia E., Gaiti A.: Effect of exercise training, selenium and vitamin E on some free radical scavengers in horses (*Equus caballus*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 1999, 123, 147-154.
3. Avellini L., Silvestrelli M., Gaiti A.: Training-induced modifications in some biochemical defences against free radicals in equine erythrocytes. *Vet. Res. Commun.* 1995, 19, 179-184.
4. Bartosz G.: Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004.
5. Bartosz G.: Rola reaktywnych form tlenu w apoptozie. *Post. Biochem.* 1998, 44, 22-31.
6. Benson R. M., Minter L. M., Osborne B. A., Granowitz E. V.: Hyperbaric oxygen inhibits stimulus-induced proinflammatory cytokine synthesis by human blood-derived monocyte-macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 2003, 134, 57-62.
7. Breen A. P., Murphy J. A.: Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic. Biol. Med.* 1995, 18, 1033-1077.
8. Clarkson P. M., Thompson H. S.: Antioxidants: What role do they play in physical activity and health? *Am. J. Clin. Nutr.* 2000, 72 (Suppl.), 637-646.
9. Cooper C. E., Vollaard N. B. J., Choueri T., Wilson M. T.: Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 2002, 30, 280-285.
10. Davies K. J. A.: Protein modification by oxidants and the role of proteolytic enzymes. *Biochem. Soc. Trans.* 1993, 21, 346-353.
11. Davies K. J. A., Quintilha A. T., Brooks G. A., Packer L.: Free radical and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 1982, 82, 1198-1205.
12. Deaton C. M., Marlin D. J.: Exercise-associated oxidative stress. *Clin. Tech. Equine Pract.* 2003, 2, 278-291.
13. Dinis T. C. P., Almeida L. H., Madeira V. M. C.: Lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum membrane and biophysical properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993, 301, 256-264.
14. Dröge W.: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 2002, 82, 47-95.
15. Duda-Chodak A., Tarko T.: Wolne rodniki – za i przeciw. *Laboratorium* 2007, 11, 48-50.
16. Escobar J. A., Rubio M. A., Lissi E. A.: SOD and catalase inactivation by singlet oxygen and peroxy radicals. *Free Radic. Biol. Med.* 1996, 20, 285-290.
17. Franco A. A., Odom R. S., Rando T. A.: Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. *Free Radic. Biol. Med.* 1999, 27, 1122-1132.
18. Frankiewicz-Jozko A., Szarska E.: Anti-oxidant level to exercise in the blood of endurance horses. *Biol. Sport* 2000, 17, 217-227.
19. Gajewski M., Kamińska E., Wysocki L., Szczepanik S., Sygitowicz G., Wojciechowski M., Pachecka J., Maśliński S.: Gospodarka tlenowa w organizmie. Część I. Warunki normy fizjologicznej. *Życie Wet.* 2005, 80, 380-386.
20. Górecka R.: Ocena wybranych wskaźników ochrony antyoksydacyjnej we krwi koni. Praca doktorska, SGGW, Warszawa 2001.
21. Hamlin M. J., Hopkins W. G.: Retrospective trainer-reported incidence and predictors of health and training-related problems in Standardbred racehorses. *J. Equine Vet. Sci.* 2003, 23, 443-452.
22. Hargreaves B. J., Kronfeld D. S., Waldron J. N., Lopes M. A., Gay L. S., Saker K. E., Cooper W. L., Sklan D. J., Harris P. A.: Antioxidant status of horses during two 80-km endurance races. *J. Nutr.* 2002, 132, 1781-1783.
23. Inoue M., Sato E. F., Nishikawa M., Park A. M., Imada I., Utsumi K.: Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr. Med. Chem.* 2003, 19, 2495-2505.
24. Janssen-Heininger Y. M., Poynter M. E., Baeuerle P. A.: Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. *Free Radic. Biol. Med.* 2000, 28, 1317-1327.
25. Jewett S. L., Eddy L. J., Hochstein P.: Is the autooxidation of catecholamines involved in ischemia-reperfusion injury? *Free Radic. Biol. Med.* 1989, 6, 185-188.
26. Ji L. L., Leeuwenburgh C., Leichtweis S., Gore M., Fiebig R., Hollander J., Bejma J.: Oxidative stress and aging: Role of exercise and its influences on antioxidant systems. *Ann. NY Acad. Sci.* 1998, 854, 102-117.
27. Kaikkonen J., Kosonen L., Nyssönen K., Porkkala-Sarataho E., Salonen R., Korpela H., Salonen J. T.: Effect of combined coenzyme Q10 and d-alpha-tocopheryl acetate supplementation on exercise-induced lipid peroxidation and muscular damage: A placebo-controlled double-blind study in marathon runners. *Free Radic. Res.* 1998, 29, 85-92.

28. Kamata H., Hirata H.: Redox regulation and cellular signalling. *Cell. Signal.* 1999, 11, 1-14.
29. Kinnunen S.: Oxidative Stress in Skeletal Muscle After Acute Exercise. Publications of the University of Eastern Finland, Dissertations in Health Science 2011, 70.
30. Kinnunen S., Atalay M., Hyyppä S., Lehmuskero A., Hänninen O., Oksala N.: Effects of prolonged exercise on oxidative stress and antioxidant defense in endurance horse. *J. Sports Sci. Med.* 2005, 4, 415-421.
31. Kinnunen S., Hyyppä S., Lehmuskero A., Oksala N., Mäenpää P., Hänninen O., Atalay M.: Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and exercise-induced oxidative stress in trotters. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2005a, 95, 550-556.
32. Kirschvink N., Fiévez L., Bougnet V., Art T., Degand G., Smith N., Marlin D., Roberts C., Harris P., Lekeux P.: Effect of nutritional antioxidant supplementation on systemic and pulmonary antioxidant status, airway inflammation and lung function in heaves-affected horses. *Equine Vet. J.* 2002a, 34 (Suppl.), 705-712.
33. Kirschvink N., Smith N., Fiévez L., Bougnet V., Art T., Degand G., Marlin D., Roberts C., Genicot B., Lindsey P., Lekeux P.: Effect of chronic airway inflammation and exercise on pulmonary and systemic antioxidant status of trained and heaves-affected horses. *Equine Vet. J.* 2002, 34 (Suppl.), 563-571.
34. Kleinveld H. A., Swaak A. J., Hack C. E., Koster J. F.: Interactions between oxygen free radicals and proteins. Implications for rheumatoid arthritis. An overview. *Scand. J. Rheumatol.* 1989, 18, 341-352.
35. Knight J. A.: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2000, 30, 145-158.
36. Kovacs P., Juranek I., Stankovicova T., Svec P.: Lipid peroxidation during acute stress. *Pharmazie* 1996, 51, 51-53.
37. Kuwabara M., Inukai N., Inanami O., Miyake Y., Tsunoda N., Maki Y., Sato F.: Lipid peroxide levels and superoxide-scavenging abilities of sera obtained from hotbred (Thoroughbred) horses. *J. Vet. Med. Sci.* 1996, 58, 97-101.
38. Liu J., Yeo H. C., Övervik-Douki E., Hagen T., Doniger S. J., Chu D. W., Brooks G. A., Ames B. N.: Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J. Appl. Physiol.* 2000, 89, 21-28.
39. Lovlin R., Cottle N., Pyke I., Kavanagh M., Belcastrol A. N.: Are indices of free radical damage related to exercise intensity? *Eur. J. Appl. Physiol.* 1987, 56, 313-316.
40. Marlin D. J., Fenn K., Smith N., Deaton C. D., Roberts C. A., Harris P. A., Dunster C., Kelly F. J.: Changes in circulatory antioxidant status in horses during prolonged exercise. *J. Nutr.* 2002, 132 (Suppl. 2), 1622-1627.
41. Matés J. M., Pérez-Gómez C., Núñez de Castro I.: Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* 1999, 32, 595-603.
42. McCord J. M.: The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* 2000, 108, 652-659.
43. Mills P. C., Higgins A. J.: Oxidant injury, nitric oxide and pulmonary vascular function: implications for the exercising horse. *Vet. J.* 1997, 153, 125-148.
44. Mills P. C., Roberts C. A., Smith N. C.: Effects of ozone and airway inflammation on glutathione status and iron homeostasis in the lungs of horses. *Am. J. Vet. Res.* 1996a, 57, 1359-1363.
45. Mills P. C., Smith N. C., Casas I., Harris P., Harris R. C., Marlin D. J.: Effects of exercise intensity and environmental stress on indices of oxidative stress and iron homeostasis during exercise in the horse. *Eur. J. Appl. Physiol.* 1996, 74, 60-66.
46. Moffarts B. de, Kirschvink N., Art T., Pincemail J., Michaux C., Cayeux K., Defragine J. O., Lekeux P.: Impact of training and exercise intensity on blood antioxidant markers in healthy Standardbred horses. *Equine Comp. Exerc. Physiol.* 2004, 1, 211-220.
47. Moffarts B. de, Kirschvink N., van Erck E., Art T., Pincemail J., Lekeux P.: Assessment of the oxidant-antioxidant blood balance in a field exercise test in standardbred and eventing horses. *Equine Comp. Exerc. Physiol.* 2005, 2, 253-261.
48. Ono K., Inui K., Hasegawa T., Matsuki N., Watanabe H., Talagi S., Hasegawa A., Tomoda I.: The changes of antioxidative enzyme activities in equine erythrocytes following exercise. *Nippon Juigaku Zasshi* 1990, 52, 759-765.
49. Powers S. K., Ji L. L., Leeuwenburgh C.: Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1999, 31, 987-997.
50. Quindry J. C., Stone W. L., King J., Broeder C. E.: The effects of acute exercise on neutrophils and plasma oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2003, 35, 1139-1145.
51. Rokitzki L., Logemann E., Huber G., Keck E., Keul J.: Alpha-tocopherol supplementation in racing cyclists during extreme endurance training. *Int. Sport Nutr.* 1994, 4, 253-264.
52. Rutkowski R., Pancewicz S. A., Rutkowski K., Rutkowska J.: Znaczenie reaktywnych form tlenu i azotu w patomechanizmie procesu zapalnego. *Pol. Merk. Lek.* 2007, 23, 131-136.
53. Schneider C. D., de Oliveira A. R.: Oxygen free radicals and exercise: mechanisms of synthesis and adaptation to the physical training. *Rev. Bras. Med. Esporte* 2004, 10, 314-318.
54. Semman S.: Dietary versus cellular zinc. The antioxidant paradox. *Free Radic. Biol. Med.* 1993, 14, 950-977.
55. Sen C. K.: Oxidants and antioxidants in exercise. *J. Appl. Physiol.* 1995, 79, 675-686.
56. Siciliano P. D., Parker A. L., Lawrence L. M.: Effect of dietary vitamin E supplementation on the integrity of skeletal muscle in exercised horses. *J. Anim. Sci.* 1996, 75, 1553-1560.
57. Sies H.: Strategies of antioxidant defence. *Eur. J. Biochem* 1993, 2, 213-219.
58. Sies H., Stahl W., Sundquist A. R.: Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann. NY Acad. Sci.* 1992, 669, 7-20.
59. Silveira L. R., Pereira-Da-Silva L., Juel C., Hellsten Y.: Formation of hydrogen peroxide and nitric oxide in rat skeletal muscle cells during contractions. *Free Radic. Biol. Med.* 2003, 35, 455-464.
60. Souza T. P. de, de Oliveira P. R., Pereira N.: Physical exercise and oxidative stress. Effect of intense physical exercise on the urinary chemiluminescence and plasmatic malondialdehyde. *Rev. Bras. Med. Esporte* 2005, 11, 97-101.
61. Spletstoesser W. D., Schuff-Werner P.: Oxidative stress in phagocytes – „The enemy within”. *Microsc. Res. Tech.* 2002, 57, 441-455.
62. Sriram K. I., Lakshmi C. J.: Endurance exercise-induced alterations in antioxidant enzymes of old albino male rats. *Curr. Sci.* 2001, 80, 921-923.
63. Suzuki K., Sato H., Kikuchi T., Abe T., Nakaji S., Sugawara K., Totsuka M., Sato K., Yamaya K.: Capacity of circulating neutrophils to produce reactive oxygen species after exhaustive exercise. *J. Appl. Physiol.* 1996, 81, 1213-1222.
64. Toskulkaeo C., Glinsukon T.: Endurance exercise and muscle damage: relationship to lipid peroxidation and scavenging enzymes in short and long distance runners. *Jpn J. Phys. Fitness Sports Med.* 1996, 45, 63-70.
65. Valberg S., Häggendal J., Lindholm A.: Blood chemistry and skeletal muscle metabolic responses to exercise in horses with recurrent exertional rhabdomyolysis. *Equine Vet. J.* 1993a, 25, 17-22.
66. Valberg S., Jonsson L., Lindholm A., Holmgren N.: Muscle histopathology and plasma aspartate aminotransferase, creatine kinase and myoglobin changes with exercise in horses with recurrent exertional rhabdomyolysis. *Equine Vet. J.* 1993, 25, 11-16.
67. White A., Estrada M., Walker K., Wisnia P., Filguera G., Valdes F., Arana O., Behn C., Martinez P.: Role of exercise and ascorbate on plasma antioxidant capacity in thoroughbred race horses. *Comp. Biochem. Physiol.* A 2001, 128, 99-104.
68. Williams C. A., Kronfeld D. S., Hess T. M., Saker K. E., Waldron J. N., Crandell K. M., Hoffman R. M., Harris P. A.: Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an 80-km endurance race. *J. Anim. Sci.* 2004, 82, 588-594.
69. Williams C. A., Kronfeld D. S., Hess T. M., Waldron J. N., Saker K. E., Hoffman R. M., Harris P. A.: Oxidative stress in horses in three 80-km races. *Equine Nutr. Phys. Soc. Proc.* 2003, 18, 47-52.
70. Wood J. L. N., Newton J. R., Chanter N., Mumford J. A.: Inflammatory airway disease, nasal discharge and respiratory infections in young British racehorses. *Equine Vet. J.* 2005, 37, 236-242.
71. Yu B. P.: Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 1994, 78, 139-162.

Adres autora: prof. dr hab. inż. Bogdan Janicki, ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz; e-mail: janicki@utp.edu.pl